

余咏诗, 刘辉. CRISPR-Cas9 技术修饰乳酸杆菌的研究进展 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(21): 461-470. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021110333

YU Yongshi, LIU Hui. Research Progress on CRISPR-Cas9 Technology to Modify *Lactobacillus*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(21): 461-470. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021110333

· 专题综述 ·

# CRISPR-Cas9 技术修饰乳酸杆菌的研究进展

余咏诗<sup>1</sup>, 刘 辉<sup>1,2,\*</sup>

(1.佛山科学技术学院食品科学与工程学院, 广东佛山 528225;

2.佛山科学技术学院医学院, 广东佛山 528000)

**摘要:** 乳酸杆菌是一种具有促进人类健康的菌株, 在食品工业中具有悠久的历史。近年来, 基因编辑技术成为了开发利用微生物的有效工具。其中, 成簇规律性间隔短回文 (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR) 及其相关因子 (CRISPR-associated, Cas) 所组成的 CRISPR-Cas9 技术由于步骤简便、效率高且准确性高等优势, 已经被广泛地运用于基因编辑的研究中。将 CRISPR-Cas9 技术应用于乳酸杆菌将促进对其本身生理特性及其促进人体健康分子机制的研究, 从而推动下一代具有定制功能乳酸杆菌的开发。本文综述了部分乳酸杆菌在食品加工中的应用以及 CRISPR-Cas9 技术在乳酸杆菌中的应用进展, 旨在为国内乳酸杆菌生物工程化的研究与开发提供一些思路。

**关键词:** 乳酸杆菌, CRISPR-Cas9, 基因编辑, 改良, 生物工程化

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2022)21-0461-10

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021110333



本文网刊:

## Research Progress on CRISPR-Cas9 Technology to Modify *Lactobacillus*

YU Yongshi<sup>1</sup>, LIU Hui<sup>1,2,\*</sup>

(1.School of Food Science and Engineering, Foshan University, Foshan 528225, China;

2.School of Medicine, Foshan University, Foshan 528000, China)

**Abstract:** *Lactobacillus* is a strain that promotes human health and has a long history of use in the food industry. In recent years, gene editing technology has become an effective tool for the development and utilization of microorganisms. Among them, CRISPR-Cas9 technology that composed of clustered regularly interspaced short palindromic repeats and its associated protein has been widely used in gene editing research due to its advantages of simple steps, high efficiency and accuracy. The application of CRISPR-Cas9 technology to *Lactobacillus* will promote the research of its own physiological characteristics and the molecular mechanism of promoting human health, thereby promoting the development of the next generation of *Lactobacillus* with customized functions. This article reviews the application of some *Lactobacillus* in food processing and the application progress of CRISPR-Cas9 technology in *Lactobacillus*, aiming to provide some ideas for the research and development of domestic *Lactobacillus* bioengineering.

**Key words:** *Lactobacillus*; CRISPR-Cas9; genome editing; improvement; bioengineering

几个世纪以来, 乳酸杆菌作为一种能发酵食物的益生菌, 已成为开发食品配方和益生菌产品最常用的微生物之一。随着对乳酸杆菌研究的不断深入, 乳酸杆菌的生理机制和生物特性被广泛开发与利用。通过对乳酸杆菌的基因进行修饰, 从而开发出具有更优良性质的可用于食品、药物生产的新型乳酸杆菌,

是目前研究的热点之一。因此, 高效的基因修饰技术是必不可缺的工具。

近年来, CRISPR-Cas9 技术以效率高、简便、成本低等特点在农业、医疗药物等领域中大放异彩<sup>[1-2]</sup>。但美中不足的是, 该技术的效率、精确性还有待提高, 同时消费者和工业界对转基因产物的安全性也持

收稿日期: 2021-11-26

基金项目: 广东省自然科学基金 (2019A1515110696)。

作者简介: 余咏诗 (1999-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品加工与安全, E-mail: 846021605@qq.com。

\* 通信作者: 刘辉 (1990-), 男, 博士, 讲师, 研究方向: 食品功能性成分研究, E-mail: tianmahui2011@163.com。

有怀疑的态度,因此经过基因修饰的产物会受到严格的监管<sup>[3]</sup>。但从科学的角度来看,基因编辑的转基因乳酸杆菌是很有潜力的,且国内外也已经允许了一部分应用 CRISPR-Cas9 技术编辑植物的使用<sup>[4-5]</sup>。因此,利用 CRISPR-Cas9 技术对乳酸杆菌进行改造是一个值得关注的研究方向。

目前,CRISPR-Cas9 技术在乳酸杆菌中的应用较少。现有研究主要集中在对乳酸杆菌自身 CRISPR-Cas 系统的分析和研究,而对乳酸杆菌原位基因修饰的研究报道并不多见。与传统的菌株改良方法相比,CRISPR-Cas9 技术可极大地提高乳酸杆菌靶向位点的正确性并做到无痕基因组修饰,通过此技术获得的菌株甚至有可能比通过传统的随机诱变方法获得的菌株更为安全<sup>[6]</sup>。随着基因编辑技术的逐渐成熟,以及大众接受程度的增加,CRISPR-Cas9 技术编辑过的乳酸杆菌将会广泛地应用到人体健康、食品工业等领域。本文对部分乳酸杆菌和 CRISPR-Cas9 技术进行介绍,对 CRISPR-Cas9 技术在乳酸杆菌中的应用与存在的问题进行综述,并展望未来 CRISPR-Cas9 技术运用到乳酸杆菌的发展趋势,期望为国内乳酸杆菌生物工程化的研究与开发提供一些思路。

## 1 乳酸杆菌的概述

乳酸菌(Lactic acid bacteria, LAB)是指能利用可发酵碳水化合物并产生大量乳酸的一类无芽孢、革兰氏染色阳性细菌<sup>[7]</sup>。这类细菌是一种分布极为广泛、具有丰富多样化的物种,以杆菌或球菌为主<sup>[8]</sup>。乳酸菌至少包括 18 个属,由 200 多种已被正式认可的物种和亚种组成<sup>[9-10]</sup>,其中乳酸杆菌(*Lactobacillus*)最为重要。乳酸杆菌不仅是人类体内的共生菌之一,而且在人类健康和食品工业等方面也起到了不可或缺的作用<sup>[11]</sup>。

早在公元 3 世纪,乳酸杆菌就已经开始被人类用于发酵食物<sup>[12]</sup>,而对乳酸杆菌长期的研究和应用早已证明了一些乳酸杆菌是安全的、具有多种功能作用的益生菌,因此它们也被广泛应用于保健食品,促进人体健康<sup>[13-15]</sup>。其中,最典型的是乳酸杆菌可以防治乳糖不耐症(喝鲜奶时出现的腹胀、腹泻等症状)<sup>[16]</sup>,

因为乳糖会被乳酸杆菌产生的乳糖酶所降解形成更容易吸收的小分子状态,使得乳糖不耐患者可以接受乳制品<sup>[17]</sup>。同时,乳酸杆菌可以增加肠道有益菌群,改善人体胃肠道功能,恢复人体肠道内的菌群平衡,形成抗菌生物屏障,维护人体健康<sup>[18-19]</sup>。此外,乳酸杆菌可抑制脂肪酸的吸收,进而减少体脂增加。Jang 等<sup>[20]</sup>利用动物喂养实验的方法分别对小鼠进行口服灌胃鼠李糖乳杆菌和生理盐水的处理,以评估鼠李糖乳杆菌(*L. rhamnosus*)对肝脏脂质积聚和造成肥胖的慢性作用,结果表明口服鼠李糖乳杆菌的小鼠肠道显著减少了对脂肪酸的吸收。

乳酸杆菌不仅对人体有着许多有益的功能,同时也是食品工业中的重要菌种,能赋予食品独特的风味以及改善食品的品质和营养成分<sup>[21]</sup>。唐立伟等<sup>[22]</sup>研究了鼠李糖乳杆菌(*L. rhamnosus*)、瑞士乳杆菌(*L. helveticus*)、副干酪乳杆菌(*L. paracasei*)等四种典型的乳酸杆菌在乳品发酵过程中的 pH、酸度变化、货架期内的活菌数变化及耐胃酸的能力,结果表明 *L. helveticus* 发酵乳产酸快但货架期短,而 *L. paracasei* 和 *L. rhamnosus* 的发酵乳货架期稳定性优良。此外,乳酸杆菌在养殖业中也发挥了重要作用,唾液乳杆菌(*L. salivarius*)可以改善鸡的生长性能,有效增加体重和免疫器官的相对重量,而且还可减轻热应激引起的器官损伤以及增强传染性法氏囊病(Infectious bursal disease virus, IBDV)疫苗免疫后的免疫应答<sup>[23]</sup>。

上述研究结果表明,乳酸杆菌不仅能促进人体健康,在发酵食品中的工业应用和养殖业等领域同样也占据着非常重要的地位。表 1 列出了一些乳酸杆菌的代表菌种及其在食品加工中的应用。

## 2 CRISPR-Cas9 技术的发现及作用机制

基因编辑是能精确插入、删除、替换生物体中含有遗传信息的基因序列的新兴技术,而 CRISPR-Cas9 是继锌指核酸酶技术(Zinc-finger nuclease, ZFNs)、转录激活因子样效应物核酸酶技术(Transcription activator-like effector nuclease, TALENs)等基因编辑技术推出后的第三代基因编辑技术。短短几年内,

表 1 部分乳酸杆菌的菌种及其在食品加工中的应用

Table 1 Some *Lactobacillus* strains and their application in food processing

菌种	产品类型	作用	参考文献
保加利亚乳杆菌 <i>L. bulgaricus</i>	发酵乳	提高乳产品的粘度,有效改善口感和防止乳清析出	[24]
	乳饮料	使乳饮料产生愉悦的风味物质,使口感柔和爽口,提升营养价值	[25]
嗜酸乳杆菌 <i>L. acidophilus</i>	果汁饮料	降低果汁的酸度,改善果汁口感	[26]
	乳饮料	产生新风味,降低胆固醇,改善口感	[27]
瑞士乳杆菌 <i>L. helveticus</i>	大豆奶酪	改善大豆奶酪的质构和风味	[28]
鼠李糖乳杆菌 <i>L. rhamnosus</i>	玉米发糕	增大硬度、增强咀嚼性、改善弹性	[29]
植物乳杆菌 <i>L. plantarum</i> 干酪乳杆菌 <i>L. casei</i>	广式腊肠	增加色泽和风味,改善品质	[30]
希氏乳杆菌 <i>L. hilgardii</i>	葡萄酒	提升香气质量	[31]
副干酪乳杆菌 <i>L. paracasei</i>	L-乳酸酸菜	生产出能被人体代谢的L-乳酸	[32]
德氏乳杆菌 <i>L. delbrueckii</i>	胞外多糖	提高胞外多糖的产量和抗氧化活性	[32]

CRISPR-Cas9 技术风靡全球, 成为现有基因编辑和基因修饰里面效率最高、最简便、成本最低、最容易上手的技术之一, 也是当今最主流的基因编辑系统。前两代基因编辑技术都需要构建结合蛋白和 Fok I 核酸内切酶的结构域组成的复杂系统。ZFNs 作为第一代基因编辑技术, 锌指蛋白能识别特定的 3 个连续碱基对, 由 Fok I 核酸内切酶的结构域负责切割 DNA, 其设计依赖上下游序列, 脱靶率高, 具有细胞毒性, 且这项技术专利被美国 Sangamo 垄断, 因此自问世以来无大规模应用<sup>[33]</sup>。第二代的 TALENs 与 ZFNs 类似, TALENs 由 TALE 基序串联成决定靶向性的 DNA 识别模块, 一个 TALE 基序识别一个碱基对, 特异性高, 细胞毒性比 ZFNs 低。但 TALENs 存在较多的重复序列, 需要大量测序工作, 且模块组装过程繁琐<sup>[34]</sup>。而 CRISPR-Cas9 技术除了靶向精准、脱靶率低、细胞毒性低等特点外, 另一个显著优势是它能够同时编辑多个基因, 利用多个 gRNAs 靶向不同的基因, 为复杂的多基因编辑研究开辟了新的可能性<sup>[35]</sup>。

CRISPR 是 1987 年由石野良纯等在大肠杆菌 (*E. coli*) 基因组中意外发现的一系列串联重复 DNA 片段, 这些片段含 29 个保守碱基且被另一段含 32 个碱基的可变序列隔开, 但当时对这种结构的生物学功能不得而知<sup>[36]</sup>。九十年代, 随着研究者在多种细菌和古细菌基因组中都发现了这种特殊的重复片段<sup>[37]</sup>, 因此在 2000 年将其统称为短规律性间隔重复 (Short regularly spaced repeat, SRSR) 序列<sup>[38]</sup>。直到 2002 年, Jansen 等<sup>[39]</sup> 对这种特殊结构进行深入研究后, 正式将这种结构命名为成簇规律性间隔短回文 (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR) 序列。随后研究者陆续发现许多与 CRISPR 序列功能相关联的基因, 并将其统称为

CRISPR-相关因子 (CRISPR-associated, Cas)。最初对于 CRISPR-Cas 功能的假设是其可能参与细胞的 DNA 限制性保护和复制子分配等过程<sup>[40]</sup>。然而在 2005 年, 有研究者提出 CRISPR-Cas 是一种适应性免疫系统的假说<sup>[41]</sup>, 且这个假说在 2007 年成功被 Barrangou 等<sup>[42]</sup> 验证。Barrangou 等<sup>[42]</sup> 发现这个系统可以将新的噬菌体 DNA 整合到 CRISPR 阵列中, 这使它们被同样的病毒再次入侵时细菌就有了抗性, 使其免遭攻击。Bolotin 等<sup>[43]</sup> 在研究嗜热链球菌 (*S. thermophilus*) 的基因组时, 发现了一个不寻常的 CRISPR 基因座。尽管这个 CRISPR 阵列与先前报道的系统相似, 但它不仅缺少一些已知的 Cas 基因, 又包含新的 Cas 基因, 包括编码大分子蛋白质的基因。Bolotin 等预测该基因表达的蛋白具有核酸酶活性, 这个基因就是 Cas9。自此, 对 CRISPR-Cas9 系统相关的研究开始增加。

目前, CRISPR-Cas 系统被分为 I、II 和 III 型三种主要类型<sup>[44]</sup>, 而 CRISPR-Cas9 属于 II 型系统。CRISPR-Cas9 系统在适应性免疫时遵循着三个步骤: 间隔序列的获取, crRNA 的形成与干扰 (图 1)。具体步骤表现为当外源病毒或质粒 DNA 进入细胞时, 细胞通过专门的 Cas 蛋白将外源 DNA 序列剪成小片段并整合到连续的 DNA 片段中, 形成一个新的 CRISPR 间隔序列<sup>[45]</sup>。然后这个新的间隔序列被转录成 CRISPR RNA 前体 (Pre-crRNA) 和反式激活 RNA (Trans-activating RNA, tracrRNA), 然后在核糖核酸酶 III (Ribonuclease III, RNase III) 的作用下形成成熟的 crRNA<sup>[46]</sup>。最后 crRNA 协同 tracrRNA 通过特异性的方式引导 Cas9 蛋白去切割入侵的目标 DNA 以达到免疫干扰的效果<sup>[47-49]</sup>。在 Cas9 蛋白被证实能对特定的 DNA 进行靶向断裂后, Jinek 等<sup>[50]</sup> 的研究指出, 可以将 CRISPR-Cas9 系统中的 crRNA

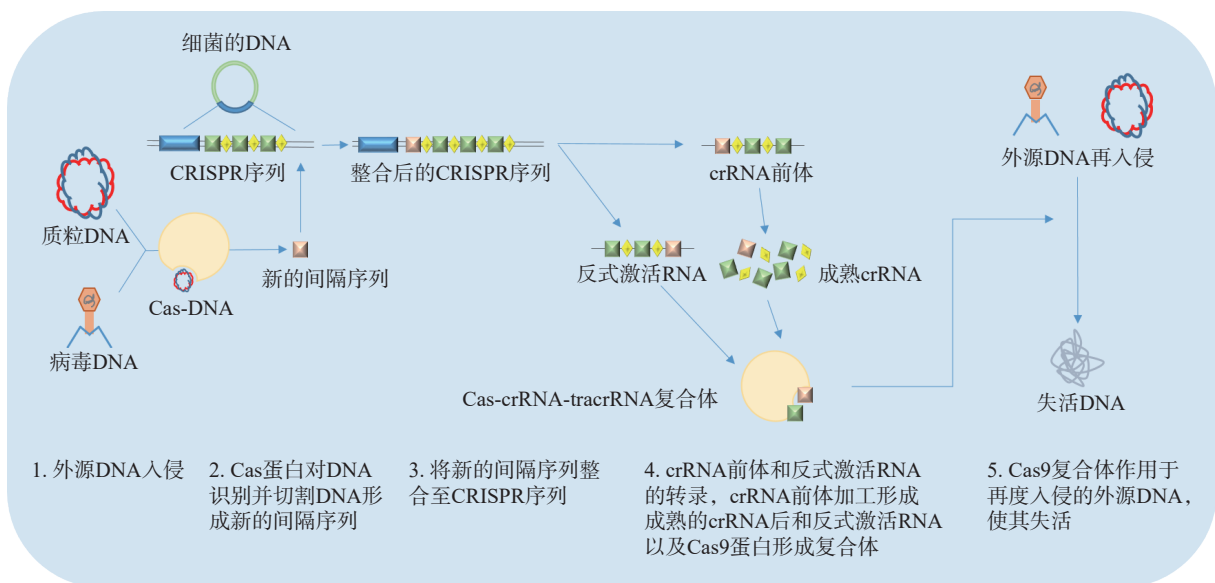


图 1 CRISPR-Cas9 系统适应性免疫的简化步骤

Fig.1 Simplified steps for adaptive immunity of CRISPR-Cas9 system



和 tracrRNA 融合在一起, 形成一个单一的合成导向 RNA, 即单导向 RNA (Single-guide RNA, sgRNA), 进一步简化了系统, 为 CRISPR-Cas9 技术广泛应用于基因靶向和基因编辑奠定了基础。之后陆续有研究者将这种技术应用于基因编辑技术。总的来说, CRISPR-Cas9 技术由于具有实验简单, 操作容易, 用时短等优势, 已经被研究者们广泛应用在植物、小鼠和人类细胞中, 并进行了临床试验<sup>[51-53]</sup>。

### 3 CRISPR-Cas9 技术应用于乳酸杆菌基因的编辑

#### 3.1 CRISPR-Cas9 技术改造乳酸杆菌

多年来, 乳酸杆菌早已被用作作为微生物工厂, 用于生产各种蛋白质和代谢产物以及生物催化剂<sup>[54-55]</sup>。通过 CRISPR-Cas9 基因编辑技术去打造更优质的菌种, 其目的在于改良乳酸杆菌的性状、提升产物的质和量, 或者降低乳酸杆菌释放污染物和有害物污染环境的风险。

利用 CRISPR-Cas9 技术可以把乳酸杆菌打造成具有优良性状的菌株。Goh 等<sup>[56]</sup>将 *L. paracasei* 细胞表面相关的果糖糖苷酶基因 *fosE* 敲入无法代谢低聚果糖 (Fructooligosaccharide, FOS) 的 *L. rhamnosus* 中, 重组菌株能在含有 FOS 的 mMRS 培养基中生长, 这表明了重组菌株拥有了对果糖的代谢能力。CRISPR-Cas9 系统还可以被编辑成选择性地靶向乳酸杆菌中的抗生素耐药基因, Hidalgo-Cantabrana 等<sup>[57]</sup>利用 CRISPR-Cas9 技术敲掉乳酸杆菌的与抗生素耐药性有关的 *tetW* 基因, 从而减少和转移了乳酸杆菌的抗生素耐药性。

在食品工业中, 乳酸杆菌常常被用于生产胞外多糖 (Exopolysaccharides, EPS), EPS 由于可赋予发酵乳制品特殊的质构和风味, 从而广泛用于食品的增稠、稳定、乳化、胶凝及持水<sup>[58]</sup>。为了进一步利用乳酸杆菌生产 EPS 的能力, 有必要对其结构与功能基因进行深入了解以达到优化生产的目的。Song 等<sup>[59]</sup>使用 CRISPR-Cas9 技术对 *L. casei* 的 EPS 生物合成基因 *LC2W-2189* 进行了敲除, 研究结果表明敲除后菌株的 EPS 产量明显降低。Mayer 等<sup>[60]</sup>鉴定出约翰逊氏乳杆菌 (*L. johnsonii*) 中的一种假定基因细菌烯醇糖基转移酶 (FI9785-242, 242) 对 EPS-1 的合成很重要, 在 *L. johnsonii* FI9785 基因组中利用 CRISPR-Cas9 技术敲除 242 基因以构建菌株  $\Delta$ 242, 而菌株  $\Delta$ 242 细胞沉淀和上清液中均未检测到 EPS-1。Dertli 等<sup>[61]</sup>研究报道指出, *L. johnsonii* FI9785 能够产生两种不同的 EPS, 分别是 EPS-1 和 EPS-2, 该研究进一步鉴定出了与 EPS 合成相关的 *eps* 基因簇, 而其中的 *epsA* 基因是合成 EPS-1 和 EPS-2 的关键基因。这些或许是乳酸杆菌 EPS 生物合成的机制的一部分, 为利用 CRISPR-Cas9 技术构建菌体外生产合成 EPS 提供了一个新的思路。Zhou 等<sup>[62]</sup>采用 CRISPR-Cas9 技术对 *L. plantarum* 进行了无缝基因

组编辑, 设计并构建了可以产生 n-乙酰氨基葡萄糖的菌株, 在未引入外源标记基因和质粒的情况下, 最终菌株的生产 n-乙酰氨基葡萄糖的量为 797.3 mg/L。Dato 等<sup>[63]</sup>研究表明酿酒酵母 (*S. cerevisiae*) 腺苷甲硫氨酸同工酶 2 (S-adenosylmethionine2, SAM2) 的表达量与 L-乳酸的合成量相关, 利用 CRISPR-Cas9 技术除掉菌株的 *SAM2* 基因后, 菌株的乳酸产量比正常菌株平均增加了 5.4%, 并且敲除掉 *SAM2* 基因基本不会影响菌株的活力。总的来说, 通过对乳酸杆菌生产代谢产物的基因结构运用生物工程的方法进行优化, 是一种非常有效且具有前景的策略手段。

除产生有益物质外, 乳酸杆菌也会产生一些对人体有害的物质, 例如 D-乳酸。因为人和动物体内并不存在 D-乳酸脱氢酶, 因此不能分解代谢 D-乳酸<sup>[64]</sup>, 人体摄入过多 D-乳酸会导致出现代谢紊乱, 甚至中毒的症状<sup>[65]</sup>。通常来说, 乳酸杆菌会同时产生两种乳酸, 分别是 L-乳酸和 D-乳酸, 而调控生产这两种乳酸的关键基因是一个 D-乳酸脱氢酶 *ldhD* 基因和 L-乳酸脱氢酶 *ldhL* 基因<sup>[66]</sup>。研究表明, 通过 CRISPR-Cas9 技术敲除或替换掉 *ldhD* 是降低乳酸杆菌生产 D-乳酸的一种有效方法。张一凡<sup>[67]</sup>通过 CRISPR-Cas9 技术构建了一株被敲除掉 *ldhD* 基因、过表达 L-乳酸脱氢酶的 *L. casei* 突变菌株, 发现突变菌株产生 L-乳酸的产量提高了 16.3%, 光学纯度也由 95.2% 提升至 99.0%, 大大提高了高纯度 L-乳酸的产量, 降低了 D-乳酸的生成。上述的研究表明利用 CRISPR-Cas9 技术可有效降低乳酸杆菌中对人体有害物质的产生。

尽管 D-乳酸对人体有害, 但不能否认它在生物可降解塑料工业中的价值。随着基因编辑技术的进步, 通过基因工程打造合适的乳酸杆菌用于生产 D-乳酸在近几年也成为了研究热点之一。Huang 等<sup>[68]</sup>研究表明 *L. bulgaricus* 的 *ldhD* 同源基因 *ldb0101* 和 *ldb1010* 在过表达的情况下能让菌株生产更多 D-乳酸。Assavasirijinda 等<sup>[69]</sup>将 *L. delbrueckii* 的 *ldhD* 基因通过 CRISPR-Cas9 技术导入工程化的嗜碱芽孢杆菌 (*B. alcalophilus*) 菌株, 并通过破坏负责合成胞外多糖的关键基因 *epsD*, 以增加产量并简化下游生产过程。Ozaki 等<sup>[70]</sup>通过 CRISPR-Cas9 基因组编辑技术将 *L. plantarum* 中的 *ldhD* 基因导入至粟酒裂殖酵母 (*S. pombe*), 并通过 CRISPR 基因敲除破坏了菌株中竞争 D-乳酸合成相关的丙酮酸脱氢酶的基因 *pdh101* 和 *pdh202* 和编码 L-乳酸的基因 *ldhL*, 显著促进了菌株利用葡萄糖转化生成 D-乳酸的效率。

近年来, 基于 CRISPR-Cas9 技术去修饰编辑菌株, 改善其性状、将其改造作为“生产工厂”来产生所需物质的报道越来越多。而乳酸杆菌作为一种公认的益生菌, 利用 CRISPR-Cas9 技术对其合理化改造将会是未来的研究的主要的方向。

### 3.2 CRISPR-Cas9 技术应用于乳酸杆菌基因编辑存在的问题

大多数天然的乳酸杆菌都属于“公认安全”标准 (Generally recognized as safe, GRAS) 的范畴, 因此, 这类乳酸杆菌在食品工业、医药等方面已经被广泛运用<sup>[71]</sup>。但目前还没有转基因乳酸杆菌被美国食品药品监督管理局认定为 GRAS, 主要是因为乳酸杆菌基因组被改造后, 其遗传的稳定性、对人体潜在的安全性尚未得知, 且现有的基因编辑技术依然存在问题缺陷, 如目标损坏、脱靶编辑、低效率等问题, 即使是目前最先进的第三代基因编辑技术 CRISPR-Cas9 也不能保证每次都能完美地打造出产品<sup>[72]</sup>。

如何提高准确率, 避免脱靶是目前基因编辑技术面临的巨大挑战。虽然 CRISPR-Cas9 相较于 ZFNs 和 TALENs 技术对靶向基因操作更加简单便捷, CRISPR-Cas9 只需要将引导 RNA 序列与特定的靶区匹配, 就可以将 Cas 酶引导到该位点, 引入双链断裂, 但同样存在脱靶的风险, 影响基因编辑成功率<sup>[73]</sup>。在利用 CRISPR-Cas9 打造乳酸杆菌时, 可能会发生靶向位点的大量缺失、基因组重排列、切割位点远端病变等脱靶效应, 从而使乳酸杆菌产生有害物质或造成乳酸杆菌的死亡, 甚至会打造成一种有害的微生物。而当这些有害物质或者重组的有害微生物没有及时处理, 被意外或人为地释放到自然界中, 有可能会打破生态平衡, 最终对人类造成严重的威胁。其中一个影响脱靶的重要原因是 CRISPR-Cas9 系统依赖于内源性 DNA 修复因子不能被有效地控制, 也不能预测该因子产生的错误<sup>[74]</sup>。为了解决缺乏稳健的 DNA 修复机制的问题, Goh 等<sup>[75]</sup> 在乳酸杆菌中的非同源性末端接合 (Non-homologous end joining, NHEJ) 的 DNA 损伤修复机制中, 利用化脓性链球菌 (*Streptococcus*) 的切口酶变体 Cas9<sup>D10A</sup> 在嗜酸乳杆菌 (*L. acidophilus*) 中进行靶向基因删除和插入, 从而减少因为双链断裂引起 *L. acidophilus* 的死亡。尽管现在已有科学家研究开发出缓解脱靶问题的方法, 但是造成脱靶有着许多因素的影响, 如细胞类型、CRISPR-Cas9 组件的表达水平、传递方法等, 一个因素或多个因素共同影响都会导致脱靶<sup>[76]</sup>。目前, CRISPR-Cas9 系统号称能实现多个基因的编辑, 但在大规模地打造乳酸杆菌的过程中, 其精确性、效率仍然有上升的空间。Leenay 等<sup>[77]</sup> 在 *L. plantarum* 中使用 CRISPR-Cas9 技术进行基因编辑, 但多次编辑 *L. plantarum* 同一位点并不总是成功的, 编辑的结果也会因运用的方法和打造的菌株种类而产生差异。总的来说, 有效地解决脱靶问题, 同时提高基因编辑的效率和精确性, 是研究者们目前亟待解决的问题。

CRISPR-Cas9 技术修饰乳酸杆菌仍需要面对许多挑战, 且该技术的有些机制人类尚未完全掌握, 如潜在靶位点识别机制和原间隔序列邻近基 (Protospacer-adjacent motif, PAM) 依赖的基础等<sup>[77]</sup>。尽管

目前从科学的角度看, 转基因乳酸杆菌有着更加合理、优良的性状, 能成为代谢产物的生产工厂, 但人们依然对转基因乳酸杆菌闻之色变, 认为其已被基因操控, 对人体产生的风险是一个未知数。因此, 在广泛应用转基因乳酸杆菌之前, 政府和科学家们都要进行批判性的风险评估。随着 CRISPR-Cas9 技术地不断发展, 科学家们需要不断地研究克服技术缺陷, 这将会打造出更加稳定的转基因乳酸杆菌。

### 3.3 CRISPR-Cas9 技术应用于乳酸杆菌未来展望

#### 3.3.1 改善乳酸杆菌的抗胁迫性

乳酸杆菌被广泛地应用于食品工业的过程中, 需要面对在生产、储存和分配过程中所形成的物理、化学多种胁迫, 影响乳酸杆菌发挥生理功能。乳酸杆菌作为发酵剂在发酵过程中, 其稳定性影响着发酵工艺, 而作为益生菌被人体食用后, 则需要在对肠道的恶劣条件中存活才能发挥其活性。因此, 运用 CRISPR-Cas9 技术对乳酸杆菌的基因进行改造, 使乳酸杆菌具有更强的稳定性, 从而适应不同条件的生存环境。

乳酸杆菌在工业发酵时自身会产生有机酸, 常常面临酸胁迫, 导致乳酸杆菌的细胞活力和发酵产量降低。谷氨酸脱羧酶 (The glutamate decarboxylase, GAD) 系统是乳酸杆菌最重要的抗酸系统之一<sup>[78]</sup>。正因为 GAD 的抗酸能力的存在, 乳酸杆菌才能在酸胁迫环境下抑制杂菌生长的同时自身也能够正常发酵生长。Gong 等<sup>[79]</sup> 在研究短乳杆菌 (*L. brevis*) 的 GAD 系统时, 发现 *L. brevis* 的 GAD 系统中潜在的转录调节基因 *gadR* 所表达的 GadR 蛋白一旦失活, 会极大地降低制药工业中的一种重要化合物— $\gamma$ -氨基丁酸 (Gamma-aminobutyric acid, GABA) 的产生, 同时也降低了 *L. brevis* 的耐酸性。该研究表明 GadR 是调控 *L. brevis* 的耐酸性和 GABA 合成的正反馈调节剂。可以预想的是, 通过 CRISPR-Cas9 构建高表达 GadR 的乳酸杆菌是增强菌种抗酸性及工业化规模生产 GABA 的有效方法。Gong 等<sup>[80]</sup> 研究表明 *L. brevis* 中的氮代谢全局性转录调控蛋白基因 *glnR* 表达的 GlnR 蛋白能够影响细菌的抗酸性和 GABA 的产生。该研究证实了 GlnR 是一种负调控 GAD 表达的蛋白, 能够降低细菌的抗酸性和 GABA 的转化合成。因此, 通过 CRISPR-Cas9 技术敲除掉 *glnR* 基因也是一种增强菌株抗胁迫能力的有效方法。

温度也是影响乳酸杆菌活性的重要条件之一。在食品工业中, 为了保持食品的安全卫生, 发酵食品常常需要经过加热、巴氏消毒法进行杀菌, 这也导致乳酸杆菌的数量和细胞活力急速下降, 因此提高乳酸杆菌的抗热性在食品生产加工中尤为重要。热休克反应 (Heat shock response, HSR) 是乳酸杆菌面对热压力产生的防御适应反应, 诱导热休克蛋白 (Heat shock proteins, HSPs) 的基因表达, 形成如小热休克蛋白、Clp ATP 酶等帮助受损细胞蛋白重新折叠的分子蛋白和 ClpP、FtsH 等来降解不可逆转的受损蛋



白质的蛋白酶,从而改善乳酸杆菌对外界热变化的适应性<sup>[81]</sup>。Chastanet等<sup>[82]</sup>证实,HSP中的 $clpP$ 基因和 $clpE$ 基因受到三级应激基因阻遏物CtsR和HrcA的双重调控作用。当发生热休克反应,HrcA会失活,同时CtsR调控ClpEP复合物进行表达,进而ClpEP复合物把CtsR降解。因CtsR是一种高度保守的转录抑制因子,当CtsR被降解后,其控制Clp ATP酶才能全部表达来提高乳酸杆菌对热的适应性<sup>[81]</sup>。Desmond等<sup>[83]</sup>对*L. paracasei*的 $groESL$ 操纵子进行PCR扩增诱导表达,当重组菌株受到热应激时,生产过量GroESL蛋白,大大提高耐热性。因此,可以通过CRISPR-Cas9技术修饰HSPs相关基因,增强对HSPs的诱导,从而使乳酸杆菌能在高温下保持活性。

在食品加工中改善乳酸杆菌的抗胁迫性是非常有必要的。在外界的压力下,乳酸杆菌的抗胁迫性越强,就越能在食品加工中保持细胞活性,从而在开发的产品中展现出其独特的生理功能。

### 3.3.2 利用CRISPR-Cas9技术增强乳酸杆菌的抗菌活性

乳酸杆菌被广泛用于食品和制药工业中,很大原因是乳酸杆菌具有良好的抗菌活性,而乳酸杆菌的抗菌机制很复杂,其中很重要的一个方面则是能产生细菌素<sup>[84]</sup>。细菌素是核糖体合成的蛋白质或短肽链,具有一定的抗菌活性,可以通过与特定的表面受体相互作用导致细胞的破裂<sup>[85]</sup>,从而抑制特定的或有着相关结构的菌株的生长,因此可被食品工业用于生物防腐。

目前研究最多且应用最广泛的乳酸链球菌细菌素(Nisin,亦称乳链菌肽)被认为是食品和制药工业中用于防止食物变质和杂菌污染生长的重要化合物<sup>[86]</sup>。近年来,随着对细菌素研究的深入,通过生物工程的方法对Nisin进行编辑修饰的研究越来越多。Reiners等<sup>[87]</sup>对乳酸乳球菌(*L. lactis*)的Nisin的基因序列的N端区域进行定点诱变,诱导表达得到Nisin A和Nisin H。测试两种Nisin的对金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)的最小抑菌浓度,结果显示Nisin A的最小抑菌浓度是 $6.25 \mu\text{mol/L}$ ,而Nisin H为 $0.78 \mu\text{mol/L}$ ,显然,经过定点突变的Nisin H比Nisin A抗菌效力更好。同样,O'sullivan等<sup>[88]</sup>发现由头状葡萄球菌(*S. capitis*)菌株所产生的乳链菌肽变体Nisin J对多种革兰氏阳性病原体都表现出较强的抗菌活性,使用打孔扩散法测试Nisin A和Nisin J对金黄色葡萄球菌的抗菌能力,Nisin J的抑菌圈面积为 $153.1 \text{ mm}^2$ ,而Nisin A的抑菌圈面积只有 $109.4 \text{ mm}^2$ 。而Nisin J相比于典型的Nisin A在结构上的区别在于其中有9个氨基酸都发生了变化,这导致了Nisin J缺少了乳链菌肽调节基因 $nisR$ 、 $nisK$ 和乳链菌肽免疫基因 $nisI$ ,从而形成了一种新型的抗菌细菌素。上述研究是基于通过PCR定点诱变的方法得到乳链菌肽,这也说明了通过生物工程的方法去改造乳酸杆菌进而得到更完善的益生菌是可能的。Oh等<sup>[89]</sup>利用CRISPR-

Cas9对罗伊氏乳杆菌(*L. reuteri*)的 $NisR$ 和 $NisK$ 基因进行定点饱和诱变,对含有NNK基序(N=A/T/G/C和K=G/T)的寡核苷酸进行一次转化,其中一个密码子被修饰为编码所有20个氨基酸,结果发现这一重组体增强*L. reuteri*的抗菌活性。Van等<sup>[90]</sup>对*L. reuteri*构建单链DNA(ssDNA)重组工程,在 $pdu$ 操纵子上游的启动子区域进行了6个碱基变化,从而使抗微生物化合物罗伊氏菌素的产量增加了3倍,且与野生型菌株相比,对*E. coli*的杀伤效率提高了3倍。随着技术的不断完善,研究者通过CRISPR-Cas9技术对一些有益的乳酸杆菌的染色体中的密码子进行精确诱变,打造出具有强抗菌性的乳酸杆菌是可以实现的<sup>[79-80]</sup>。

乳酸杆菌产生的细菌素在抑菌谱、产量、稳定性等方面还能进一步改进和提升,上述的研究成果为利用CRISPR-Cas9技术去修饰乳酸杆菌的抗菌活性,并将其改造为一种更有价值的益生菌菌株的研究与开发提供了新思路。

### 3.3.3 改变乳酸杆菌的免疫调节特性

对乳酸杆菌中有助于免疫调节的相关基因进行编辑修饰,是改变乳酸杆菌免疫调节特性的方法之一。一些乳酸杆菌对宿主具有调节、改善或防止免疫有关的疾病的功效<sup>[1-2]</sup>,Steidler等<sup>[91]</sup>构建重组*L. lactis*分泌小鼠白细胞介素10(IL-10),当小鼠口服重组菌株可显著减少肠道炎症,这是最先将转基因乳酸菌运用在调节免疫治疗中,为治疗炎症性肠病(Inflammatory bowel disease, IBD)提供新的思路。尽管现在科学家们还缺乏对细菌类的免疫特性整体机制的理解,但有相关研究表明,细菌的外细胞表面蛋白在细菌与宿主之间的相互作用中起了关键的作用<sup>[92]</sup>。细菌的细胞外壁通常由细胞壁和细胞膜组成,但在许多古细菌和真细菌中发现还有一层表面层(Surface layers)结构,也称为s-层(S-layers)<sup>[93]</sup>,该层是通过一类特殊的蛋白质(称为S层蛋白)之间的相互作用所构建的二维晶格结构所组成<sup>[94]</sup>。许多研究结果都表明了S层蛋白具有介导免疫调节的功能,为改变乳酸杆菌免疫调节特性提供了潜在的目标。SIGNR3是小鼠8个同源的树突细胞受体(DC-specific ICAM-grabbing non-integrin, DC-SIGN)之一,与人DC-SIGN的生物特征高度相似<sup>[95]</sup>。Lightfoot等<sup>[96]</sup>研究发现了*L. acidophilus*的S层蛋白可与小鼠的SIGNR3连接,进而表达出调控信号,缓解小鼠的结肠炎症。而Johnson等<sup>[97]</sup>的研究中也发现了*L. acidophilus*中与S层相关的丝氨酸蛋白酶同源物PrtX(PrtX, Iba1578)突变增强了对白细胞介素6(Interleukin 6, IL-6)、IL-12和IL-10的刺激,可能导致改变上皮肠细胞基质的结构和特性。此外,Uroic等<sup>[98]</sup>发现了*L. brevis*在有S层蛋白的情况下会对机体产生特别的保护以及增强了对肠细胞的粘附作用,并且*L. brevis*的S层蛋白可以在单核细胞衍生的树突状细胞(Monocyte-derived

dendritic cells, moDC)中诱导肿瘤坏死因子- $\alpha$ (Tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )的生成。除了发酵乳杆菌(*L. fermentum*)和*L. bulgaricus*等某些物种不会产生 S 层结构,许多原核生物中都存在 S 层结构,且 S-层的结构都是保守的,不会轻易地变异<sup>[99]</sup>。通过运用 CRISPR-Cas9 基因编辑技术去精确改变某些乳酸杆菌 S 层蛋白的表达,可以做到稳定长期地增强这类菌株的益生功能。

总的来说,对一些精选出来的益生菌或非益生菌的结构更深入的了解,利用 CRISPR-Cas9 技术敲入高诱导性启动子来驱动这些基因的过表达,进而调整优化这些结构来达到改变其免疫特性的目的。

#### 4 结语

乳酸杆菌作为一种与人类生活密切联系的微生物,在农业、工业和医药等领域都发挥着重要的作用。而随着人们生活水平的不断提高以及对美好生活的需要,开发一些更符合人民需求且更优良的新型乳酸杆菌变得尤为重要。近年来,通过 CRISPR-Cas9 基因编辑技术打造改良菌株的技术方法引起了国内外学者的广泛关注,大批研究者通过该技术改造乳酸杆菌,但转基因乳酸杆菌的应用仍处于实验室验证阶段。目前作为新一代的基因编辑技术 CRISPR-Cas9 仍然存在脱靶的问题,精确性和效率有待提高。因此,科学家们不断地追求着更加精准、高效的 CRISPR-Cas9 介导乳酸杆菌的基因编辑方法,并将其运用到不同种类的乳酸杆菌中。为了满足人类的需要,改善乳酸杆菌的特性和功能,通过 CRISPR-Cas9 技术打造出具有高抗胁迫性、高抗菌活性、不同的免疫活性等特性的乳酸杆菌,将会是未来发展的趋势。可以预见的是,随着 CRISPR-Cas9 技术进一步地发展以及对一些精选出来的乳酸杆菌的基因结构进行更深入的了解后,将有望打造出更优良且能够被公众所接受的乳酸杆菌菌株。

#### 参考文献

- [1] PAUL A K, PAUL A, JAHAN R, et al. Probiotics and amelioration of rheumatoid arthritis: Significant roles of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus*[J]. *Microorganisms*, 2021, 9(5): 1070.
- [2] STEINER N C, LORENTZ A. Probiotic potential of *Lactobacillus* species in allergic rhinitis[J]. *International Archives of Allergy and Immunology*, 2021, 182(9): 807-818.
- [3] 刘培琴, 韦婷. 浅谈转基因食品安全问题及管理模式[J]. *现代食品*, 2019(21): 154-156. [LIU P Q, WEI T. The safety problem and management mode of genetically modified food[J]. *Modern Food*, 2019(21): 154-156.]
- [4] 闫洪波, 高艳丽, 孙世卫, 等. CRISPR/Cas 系统在植物抗病毒中的应用[J]. *草业科学*, 2019, 36(5): 1405-1414. [YAN H B, GAO Y L, SUN S W, et al. Application of CRISPR/Cas system in anti-plant virus research[J]. *Pratacultural Science*, 2019, 36(5): 1405-1414.]
- [5] WANG T, ZHANG H, ZHU H. CRISPR technology is revolutionizing the improvement of tomato and other fruit crops[J]. *Horticulture Research*, 2019, 6(1): 781-793.
- [6] JOHANSEN E. Future access and improvement of industrial lactic acid bacteria cultures[J]. *Microbial Cell Factories*, 2017, 16(1): 230.
- [7] AGRIPOULOU S, STAMATELOPOULOU E, SACHADYIN-KRÓL M, et al. Lactic acid bacteria as antibacterial agents to extend the shelf life of fresh and minimally processed fruits and vegetables: Quality and safety aspects[J]. *Microorganisms*, 2020, 8(6): 952.
- [8] BEHERA S S, RAY R C, ZDOLEC N. *Lactobacillus plantarum* with functional properties: An approach to increase safety and shelf-life of fermented foods[J]. *BioMed Research International*, 2018, 2018: 1-18.
- [9] SALVETTI E, TORRIANI S, FELIS G E. The genus *Lactobacillus*: A taxonomic update[J]. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2012, 4(4): 217-226.
- [10] SUN Z, HARRIS H M B, MCCANN A, et al. Expanding the biotechnology potential of *Lactobacilli* through comparative genomics of 213 strains and associated genera[J]. *Nature Communications*, 2015, 6: 8322.
- [11] DI CERBO A, PALMIERI B, APONTE M, et al. Mechanisms and therapeutic effectiveness of *Lactobacilli*[J]. *Journal of Clinical Pathology*, 2016, 69(3): 187-203.
- [12] 陈丽华. 乳酸杆菌对 ApoE(-/-) 小鼠动脉粥样硬化形成的影响及机制研究[D]. 长沙:中南大学, 2013. [CHEN L H. Study on suppressed effect of *Lactobacilli* on atherogenesis in ApoE(-/-) mice and its mechanism[D]. Changsha: Central South University, 2013.]
- [13] ABDEL-DAIM A, HASSOUNA N, HAFEZ M, et al. Antagonistic activity of *Lactobacillus* isolates against salmonella typhi *in vitro*[J]. *BioMed Research International*, 2013, 2013: 680605.
- [14] PRABHURAJESHWAR C, CHANDRAKANTH R K. Probiotic potential of *Lactobacilli* with antagonistic activity against pathogenic strains: An *in vitro* validation for the production of inhibitory substances[J]. *Biomedical Journal*, 2017, 40(5): 270-283.
- [15] MU Q, TAVELLA V J, LUO X M. Role of *Lactobacillus reuteri* in human health and diseases[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9(APR): 1-17.
- [16] SZILAGYI A, ISHAYEK N. Lactose intolerance, dairy avoidance, and treatment options[J]. *Nutrients*, 2018, 10(12): 1994.
- [17] 祁敏. 应用 CRISPR-Cas9 技术在植物乳杆菌中进行基因编辑的研究[D]. 南京:南京师范大学, 2019. [QI M. Study of a gene editing technique-CRISPR/Cas9 in *Lactobacillus plantarum*[D]. Nanjing: Nanjing Normal University, 2019.]
- [18] PASOLLI E, DE FILIPPIS F, MAURIELLO I E, et al. Large-scale genome-wide analysis links lactic acid bacteria from food with the gut microbiome[J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 1-12.
- [19] BRADSHAW M J, BHATTACHARYYA S, VENNA N, et al. Neurologic manifestations of systemic rheumatologic diseases[Z](2020).
- [20] JANG H R, PARK H J, KANG D, et al. A protective mechanism of probiotic *Lactobacillus* against hepatic steatosis via reduc-

- ing host intestinal fatty acid absorption[J]. *Experimental and Molecular Medicine*, 2019, 51(8): 1-14.
- [21] DAN T, REN W, LIU Y, et al. Volatile flavor compounds profile and fermentation characteristics of milk fermented by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10(September): 2183.
- [22] 唐立伟, 李想, 左晨旭, 等. 乳杆菌在发酵乳饮料中的应用[J]. *工业微生物*, 2020, 50(1): 44-48. [TANG L W, LI X, ZUO C X, et al. Application of *Lactobacillus* in fermented milk beverage[J]. *Industrial Microbiology*, 2020, 50(1): 44-48.]
- [23] WANG J, ISHFAQ M, GUO Y, et al. Assessment of probiotic properties of *Lactobacillus salivarius* isolated from chickens as feed additives[J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2020, 7(7): 415.
- [24] 卢兆芸, 陈海婴, 彭冬英, 等. 保加利亚乳杆菌和嗜热链球菌发酵紫红薯酸牛奶[J]. *中国乳品工业*, 2011, 39(12): 39-40. [LU Z Y, CHEN H Y, PENG D Y, et al. Purple sweet potatoes yoghurt fermented by *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*[J]. *China Dairy Industry*, 2011, 39(12): 39-40.]
- [25] 常曼曼, 李颖, 阴芳冉, 等. 保加利亚乳杆菌 LB—DR 发酵红树莓汁的特性及代谢产物研究[J]. *林业与生态科学*, 2018, 33(4): 408-414, 428. [CHANG M M, LI Y, YIN F R, et al. Characteristics and metabolites of red raspberry juice fermented by *Lactobacillus bulgaricus* LB-DR[J]. *Forestry and Ecological Sciences*, 2018, 33(4): 408-414, 428.]
- [26] 马蕊, 王鑫, 韩春然, 等. 嗜酸乳杆菌对蓝莓果汁降酸效果的研究[J]. *包装工程*, 2019, 40(17): 27-32. [MA R, WANG X, HAN C R, et al. Effect of *Lactobacillus acidophilus* on acid reduction of *Lonicera caerulea* L. juice[J]. *Packaging Engineering*, 2019, 40(17): 27-32.]
- [27] 谢雨婷, 宋明慧, 马毛毛, 等. 响应面法提高植物乳酸菌和嗜酸乳杆菌发酵椰奶的活菌数[J]. *食品与发酵工业*, 2019, 45(7): 207-212. [XIE Y T, SONG M H, MA M M, et al. Response surface methodology for optimization of coconut milk beverage's viable count fermented by *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus plantarum*[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2019, 45(7): 207-212.]
- [28] NAVEED A, 陈则华, 李理, 等. 乳酸菌发酵制备大豆奶酪豆坯的工艺研究[J]. *食品与机械*, 2008(6): 121-126. [NAVEED A, CHEN Z H, LI L, et al. Preparation of pehtze with suitable texture and flavor aspects for soy cheese production by using three *Lactobacillus* cultures[J]. *Food & Machinery*, 2008(6): 121-126.]
- [29] 罗其琪, 顾丰颖, 曹晶晶, 等. 鼠李糖乳杆菌发酵对玉米粉、玉米面团理化特性及发糕品质的影响[J]. *食品科学*, 2018, 39(18): 1-7. [LUO Q Q, GU F Y, CAO J J, et al. Effects of *Lactobacillus rhamnosus* fermentation on the physicochemical properties of corn flour and corn dough and the quality of steamed sponge cake[J]. *Food Science*, 2018, 39(18): 1-7.]
- [30] 李小妮, 于立梅, 曾晓房, 等. 干酪乳杆菌和植物乳杆菌对广式腊肠品质的影响[J]. *中国调味品*, 2020, 45(8): 31-34. [LI X N, YU L M, ZENG X F, et al. Effects of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum* on the quality of cantonese sausage[J]. *China Condiment*, 2020, 45(8): 31-34.]
- [31] 白雪菲, 金刚, 刘思, 等. 低温条件下希氏乳杆菌 Q19 苹果酸-乳酸发酵特性及其对葡萄酒香气成分的影响[J]. *食品科学*, 2020, 41(18): 146-152. [BAI X F, JIN G, LIU S, et al. Malolactic fermentation characteristics of *Lactobacillus hilgardii* Q19 at low temperature and its effect on aroma components in wine[J]. *Food Science*, 2020, 41(18): 146-152.]
- [32] 刘晓辉, 陈顺, 李扬, 等. 人工接种副干酪乳杆菌生产 L 乳酸酸菜条件的研究[J]. *中国调味品*, 2020, 45(9): 91-94. [LIU X H, CHEN S, LI Y, et al. Study on the conditions for production L-lactic acid fermented vegetables by artificial inoculation of *Lactobacillus parcases*[J]. *China Condiment*, 2020, 45(9): 91-94.]
- [33] ZHANG H X, ZHANG Y, YIN H. Genome editing with mRNA encoding ZFN, TALEN, and Cas9[J]. *Molecular Therapy*, 2019, 27(4): 735-746.
- [34] GAJ T, GERSBACH C A, BARBAS C F. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering[J]. *Trends in Biotechnology*, 2013, 31(7): 397-405.
- [35] GUPTA D, BHATTACHARJEE O, MANDAL D, et al. CRISPR-Cas9 system: A new-fangled dawn in gene editing[J]. *Life Sciences*, 2019, 232(April): 116636.
- [36] ISHINO Y, SHINAGAWA H, MAKINO K, et al. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isoenzyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product[J]. *Journal of Bacteriology*, 1987, 169(12): 5429-5433.
- [37] MOJICA F J M, DíEZ-VILLASEÑOR C, SORIA E, et al. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of archaea, bacteria and mitochondria[J]. *Molecular Microbiology*, 2000, 36(1): 244-246.
- [38] RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ D R, RAMÍREZ-SOLÍS R, GARZA-ELIZONDO M A, et al. Genome editing: A perspective on the application of CRISPR/Cas9 to study human diseases (review)[J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2019, 43(4): 1559-1574.
- [39] JANSEN R, VAN EMBDEN J D A, GAASTRA W, et al. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes[J]. *Molecular Microbiology*, 2002, 43(6): 1565-1575.
- [40] MOJICA F J M, DíEZ-VILLASEÑOR C, GARCÍA-MARTÍNEZ J, et al. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements[J]. *Journal of Molecular Evolution*, 2005, 60(2): 174-182.
- [41] POURCEL C, SALVIGNOL G, VERGNAUD G. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies[J]. *Microbiology*, 2005, 151(3): 653-663.
- [42] BARRANGOU R, FREMAUX C, DEVEAU H, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes[J]. *Science*, 2007, 315(5819): 1709-1712.
- [43] BOLOTIN A, QUINQUIS B, SOROKIN A, et al. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin[J]. *Microbiology*, 2005, 151(8): 2551-2561.
- [44] MAKAROVA K S, HAFT D H, BARRANGOU R, et al. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems[J]. *Nature*



- Reviews Microbiology*, 2011, 9(6): 467–477.
- [ 45 ] ALMENDROS C, GUZMÁN N M, DÍEZ-VILLASEÑOR C, et al. Target motifs affecting natural immunity by a constitutive CRISPR-Cas system in *Escherichia coli*[J]. *PLoS ONE*, 2012, 7(11): e50797.
- [ 46 ] DELTCHEVA E, CHYLINSKI K, SHARMA C M, et al. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III[J]. *Nature*, 2011, 471(7340): 602–607.
- [ 47 ] GARNEAU J E, DUPUIS M È, VILLION M, et al. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA[J]. *Nature*, 2010, 468(7320): 67–71.
- [ 48 ] MARRAFFINI L A, SONTHEIMER E J. CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA[J]. *Science*, 2008, 322(5909): 1843–1845.
- [ 49 ] BROUNS S J, JORE M M, LUNDGREN M, et al. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes[J]. *Science*, 2008, 321(5891): 960–964.
- [ 50 ] JINEK M, CHYLINSKI K, FONFARA I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity[J]. *Science*, 2012, 337(6096): 816–821.
- [ 51 ] CONG L, RAN F A, COX D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems[J]. *Science (New York, N Y)*, 2013, 339(6121): 819–823.
- [ 52 ] WADHWA V. Boost visas for foreign entrepreneurs[J]. *Nature*, 2017, 543(7643): 29–31.
- [ 53 ] CHEN F, DING X, FENG Y, et al. Targeted activation of diverse CRISPR-Cas systems for mammalian genome editing via proximal CRISPR targeting[J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 14958.
- [ 54 ] SRIRAMULU D D, LIANG M, HERNANDEZ-ROMERO D, et al. *Lactobacillus reuteri* DSM 20016 produces cobalamin-dependent diol dehydratase in metabolosomes and metabolizes 1, 2-propanediol by disproportionation[J]. *Journal of Bacteriology*, 2008, 190(13): 4559–4567.
- [ 55 ] BOSMA E F, FORSTER J, NIELSEN A T. *Lactobacilli* and *Pediococci* as versatile cell factories-evaluation of strain properties and genetic tools[J]. *Biotechnology Advances*, 2017, 35(4): 419–442.
- [ 56 ] GOH Y J, LEE J, HUTKINS R W, et al. Functional analysis of the fructooligosaccharide utilization operon in *Lactobacillus paracasei* 1195 functional analysis of the fructooligosaccharide utilization operon in *Lactobacillus paracasei* 1195[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73(18): 5716–5724.
- [ 57 ] HIDALGO-CANTABRANA C, O'FLAHERTY S, BARRANGOU R. CRISPR-based engineering of next-generation lactic acid bacteria[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2017, 37: 79–87.
- [ 58 ] VALERIO F, BAVARO A R, DI B M, et al. Effect of amaranth and quinoa flours on exopolysaccharide production and protein profile of liquid sourdough fermented by *Weissella cibaria* and *Lactobacillus plantarum*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11 (May): 967.
- [ 59 ] SONG X, HUANG H, XIONG Z, et al. CRISPR-Cas9<sup>D10A</sup> nickase-assisted genome editing in *Lactobacillus casei*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2017, 83(22): e01259–17.
- [ 60 ] MAYER M J, D'AMATO A, COLQUHOUN I J, et al. Identification of genes required for glucan exopolysaccharide production in *Lactobacillus johnsonii* suggests a novel biosynthesis mechanism [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2020, 86(8): e02808–19.
- [ 61 ] DERTLI E, MAYER M J, COLQUHOUN I J, et al. EpsA is an essential gene in exopolysaccharide production in *Lactobacillus johnsonii* F19785 [J]. *Microbial Biotechnology*, 2016, 9(4): 496–501.
- [ 62 ] ZHOU D, JIANG Z, PANG Q, et al. CRISPR/Cas9-assisted seamless genome editing in *Lactobacillus plantarum* and its application in N-acetylglucosamine production[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2019, 85(21): e01367–19.
- [ 63 ] DATO L, BERTERAME N M, RICCI M A, et al. Changes in SAM2 expression affect lactic acid tolerance and lactic acid production in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2014, 13: 147.
- [ 64 ] 汪雪莲, 於钊庆, 朱莉, 等. 毛细管电泳法同时测定发酵制品中 D-乳酸和 L-乳酸含量 [J]. *化学与生物工程*, 2017, 34(9): 64–67. [ WANG X L, YU Z Q, ZHU L, et al. Simultaneous determination of D- and L-lactic acids by capillary electrophoresis[J]. *Chemistry & Bioengineering*, 2017, 34(9): 64–67. ]
- [ 65 ] POHANKA M. D-lactic acid as a metabolite: Toxicology, diagnosis, and detection[J]. *BioMed Research International*, 2020, 2020(2): 3419034.
- [ 66 ] SUN L, ZHANG C, LYU P, et al. Contributory roles of two L-lactate dehydrogenases for L-lactic acid production in thermotolerant bacillus coagulans[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6(November): 37916.
- [ 67 ] 张一凡. 基于 CRISPR\_Cas9 平台构建拟干酪乳杆菌高效生产 L-乳酸生产菌株及其代谢分析研究 [D]. 上海: 华东理工大学, 2020. [ ZHANG Y F. Construction of *Lactobacillus paracasei* strain for efficient production of high-quality L-lactic acid based on CRISPR/Cas9 platform and its metabolic analysis[D]. Shanghai: East China University of Science and Technology, 2020. ]
- [ 68 ] HUANG Y, YOU C, LIU Z. Cloning of D-lactate dehydrogenase genes of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and their roles in D-lactic acid production[J]. *3 Biotech*, 2017, 7(3): 194.
- [ 69 ] ASSAVASIRIJINDA N, GE D, YU B, et al. Efficient fermentative production of polymer-grade D-lactate by an engineered *Alkaliphilic bacillus* sp. strain under non-sterile conditions[J]. *Microbial Cell Factories*, 2016, 15: 3.
- [ 70 ] OZAKI A, KONISHI R, OTOMO C, et al. Metabolic engineering of schizosaccharomyces pombe via CRISPR-Cas9 genome editing for lactic acid production from glucose and cellobiose[J]. *Metabolic Engineering Communications*, 2017, 5(August): 60–67.
- [ 71 ] PLAVEC T V, BERLEC A. Safety aspects of genetically modified lactic acid bacteria[J]. *Microorganisms*, 2020, 8(2): 297.
- [ 72 ] KARABIYIK G. Milestones of CRISPR/Cas9 system, promises and roadblocks[J]. *Cancer Treatment and Research Communications*, 2021, 26: 100304.
- [ 73 ] JAVED M R, SADAF M, AHMED T, et al. CRISPR-Cas

- system: History and prospects as a genome editing tool in microorganisms[J]. *Current Microbiology*, 2018, 75(12): 1675–1683.
- [ 74 ] BURGIO G, TEBOUL L. Anticipating and identifying collateral damage in genome editing[J]. *Trends in Genetics*, 2020, 36(12): 905–914.
- [ 75 ] GOH Y J, BARRANGOU R. Portable CRISPR-Cas9<sup>N</sup> system for flexible genome engineering in *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus gasseri*, and *Lactobacillus paracasei*[J]. *Aem*, 2021, 87(6): e02669–20.
- [ 76 ] AQUINO-JARQUIN G. Current advances in overcoming obstacles of CRISPR/Cas9 off-target genome editing[J]. *Molecular Genetics and Metabolism*, 2021, 134(1–2): 77–86.
- [ 77 ] LEENAY R T, VENTO J M, SHAH M, et al. Genome editing with CRISPR-Cas9 in *Lactobacillus plantarum* revealed that editing outcomes can vary across strains and between methods[J]. *Biotechnology Journal*, 2019, 14(3): e1700583.
- [ 78 ] GUAN N, LIU L. Microbial response to acid stress: Mechanisms and applications[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(1): 51–65.
- [ 79 ] GONG L, REN C, XU Y. Deciphering the crucial roles of transcriptional regulator GadR on gamma-aminobutyric acid production and acid resistance in *Lactobacillus brevis*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2019, 18(1): 108.
- [ 80 ] GONG L, REN C, XU Y. GlnR negatively regulates glutamate-dependent acid resistance in *Lactobacillus brevis*[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2020, 86(7): e02615–19.
- [ 81 ] RUSSO P, DLLM M, CAPOZZI V, et al. Comparative proteomic analysis of *Lactobacillus plantarum* WCFS1 and  $\Delta$ ctsR mutant strains under physiological and heat stress conditions[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2012, 13(9): 10680–10696.
- [ 82 ] CHASTANET A, FERT J, MSADEK T. Comparative genomics reveal novel heat shock regulatory mechanisms in *Staphylococcus aureus* and other gram-positive bacteria[J]. *Molecular Microbiology*, 2003, 47(4): 1061–1073.
- [ 83 ] DESMOND C, FITZGERALD G F, STANTON C, et al. Improved stress tolerance of GroESL-overproducing *Lactococcus lactis* and probiotic *Lactobacillus paracasei* NFBC 338[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(10): 5929–5936.
- [ 84 ] ALVAREZ-SIEIRO P, MONTALBÁN-LÓPEZ M, MU D, et al. Bacteriocins of lactic acid bacteria: Extending the family[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(7): 2939–2951.
- [ 85 ] ZIMINA M, BABICH O, PROSEKOV A, et al. Overview of global trends in classification, methods of preparation and application of bacteriocins[J]. *Antibiotics*, 2020, 9(9): 1–21.
- [ 86 ] DJENANE D, ABOUDAOU M, DJENANE F, et al. Improvement of the shelf-life status of modified atmosphere packaged camel meat using nisin and *Olea europaea* subsp. *laperrinei* leaf extract[J]. *Foods*, 2020, 9(9): 1336.
- [ 87 ] REINERS J, LAGEDROSTE M, GOTTSTEIN J, et al. Insights in the antimicrobial potential of the natural nisin variant nisin H[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11(October): 573614.
- [ 88 ] O’SULLIVAN J N, O’CONNOR P M, REA M C, et al. Nisin J, a novel natural nisin variant, is produced by *Staphylococcus capitis* sourced from the human skin microbiota[J]. *Journal of Bacteriology*, 2020, 202(3): e00639–19.
- [ 89 ] OH J H, VAN PIJKEREN J P. CRISPR-Cas9-assisted recombineering in *Lactobacillus reuteri*[J]. *Nucleic Acids Research*, 2014, 42(17): e131.
- [ 90 ] VAN PIJKEREN J P, NEOH K M, SIRIAS D, et al. Exploring optimization parameters to increase ssDNA recombineering in *Lactococcus lactis* and *Lactobacillus reuteri*[J]. *Bioengineered*, 2012, 3(4): 209–217.
- [ 91 ] STEIDLER L, HANS W, SCHOTTE L, et al. Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10[J]. *Science*, 2000, 289(5483): 1352–1355.
- [ 92 ] WANG R, JIANG L, ZHANG M, et al. The adhesion of *Lactobacillus salivarius* REN to a human intestinal epithelial cell line requires S-layer proteins[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7 (September 2016): 44029.
- [ 93 ] VON KÜGELGEN A, TANG H, HARDY G G, et al. In situ structure of an intact lipopolysaccharide-bound bacterial surface layer[J]. *Cell*, 2020, 180(2): 348–358.
- [ 94 ] FAGAN R P, FAIRWEATHER N F. Biogenesis and functions of bacterial S-layers[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2014, 12(3): 211–222.
- [ 95 ] SCHETTERS S T T, KRUIJSSEN L J W, CROMMENTUIJN M H W, et al. Mouse DC-SIGN/CD209a as target for antigen delivery and adaptive immunity[J]. *Frontiers in Immunology*, 2018, 9(MAY): 990.
- [ 96 ] LIGHTFOOT Y L, SELLE K, YANG T, et al. SIGNR 3-dependent immune regulation by *Lactobacillus acidophilus* surface layer protein A in colitis[J]. *The EMBO Journal*, 2015, 34(7): 881–895.
- [ 97 ] JOHNSON B R, O’FLAHERTY S, GOH Y J, et al. The S-layer associated serine protease homolog prtX impacts cell surface-mediated microbe-host interactions of *Lactobacillus acidophilus* NCFM[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8(JUN): 1185.
- [ 98 ] UROIĆ K, NOVAK J, HYNÖNEN U, et al. The role of s-layer in adhesive and immunomodulating properties of probiotic starter culture *Lactobacillus brevis* D6 isolated from artisanal smoked fresh cheese[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2016, 69: 623–632.
- [ 99 ] DO CARMO F L R, RABAH H, DE OLIVEIRA CARVALHO R D, et al. Extractable bacterial surface proteins in probiotic-host interaction[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9(APR): 645.